

## 2. Scope of Claims

1) A process for purifying the a-subunit of factor XIII by affinity chromatography, comprising bonding reversibly the a-subunit of factor XIII to a carrier matrix appropriate for a disulfide exchange reaction, and removing the a-subunit from the carrier matrix by a reaction with a reducing agent.

2) A process according to claim 1, wherein the a-subunit of factor XIII is obtained from a placenta homogenate or a platelet homogenate.

3) A process according to claim 1, wherein the a-subunit of factor XIII is obtained from blood plasma.

4) A process according to any one of claims 1 to 3, wherein factor XIII is present in a solution.

5) A process according to any one of claims 1 to 4, wherein factor XIII or a solution containing factor XIII is preliminary treated with an alkylating agent.

6) A process according to claim 5, wherein the alkylating agent is iodoacetamide or iodoacetic acid.

7) A process according to claim 6, wherein iodoacetic acid is present in a concentration of 5 to 250 mmol/l, preferably 5 to 50 mmol/l.

8) A process according to any one of claims 5 to 7, wherein alkylation is conducted in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .

9) A process according to any one of claim 6 and/or claim 7, wherein alkylation is conducted in the presence of a chelate-forming material, preferably ethylenediamine-tetraacetic acid in a concentration of 0.001 to 0.1 mol/l, preferably 0.002 to 0.02 mol/l.

10) A process according to claim 9, wherein a solution containing factor XIII is treated in the presence of 0.001 to 0.04 mol/l of ethylenediamine-tetraacetic acid with 0.005 to 0.25 mol/l of iodoacetic acid at pH 6.5 to 8.5 for 1 to 360 minutes, preferably 5 to 60 minutes.

11) A process according to any one of claims 5 to 10, wherein an alkylated material is separated after conducting alkylation preferably by dialysis or salt precipitation of a protein.

12) A process according to claim 1 or any one of claims 3 to 11, wherein a blood plasma factor XIII complex is incubated with 0.05 to 0.6 mol/l, preferably 0.05 to 0.2 mol/l in concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ .

13) A process according to any one of claims 1 to 12, wherein a solution containing factor XIII is brought into contact with a carrier matrix containing a mercapto group, preferably Thiolsepharose 4B.

14) A process according to any one of claims 1 to 13, wherein bonding to the carrier matrix is conducted preferably in the presence of 0.01 to 0.2 mol/l in concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ , preferably at pH 6.5 to 8.5.

15) A process according to claim 13 or 14, wherein the carrier matrix is previously activated by a reaction with di-2-pyridyldisulfide, 2,2'-dithiobis(pyridine N-oxide), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), derivatives of these compounds or derivatives of azodicarboxylic acid.

16) A process according to any one of claims 13 to 15, wherein a carrier matrix loaded with factor XIII is washed with a solution containing  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  in a concentration of 0.01 to 0.2 mol/l.

17) A process according to any one of claims 13 to 16, wherein a material bonded to the carrier matrix is eluted with the use of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  in a concentration of 0.01 to 0.2 mol/l and 0.005 to 0.05 mol/l of a reducing agent, preferably dithiothreitol, mercaptoethanol, ethanedithiol, glutathione or cysteine, and if necessary 0.1 to 0.7 g/ml of sucrose.

18) A process according to any one of claims 1 to 17, wherein factor XIII is one of a natural protein, factor XIII prepared by genetic engineering or the  $\alpha$ -subunit thereof, and/or an arbitral natural or artificially formed protein having a factor XIII activity.

19) A process according to any one of claims 1 to 18, wherein the activity of the  $\alpha$ -subunit of factor XIII is almost completely maintained.

20) A therapeutic composition comprising factor XIII purified by a process according to any one of claims 1 to 19 and a commonly

used and physiologically acceptable additive such as sodium chloride, albumin, glucose and sucrose.

21) Use of a therapeutic composition according to claim 20 for the therapy for coagulopathy caused by lack of factor XIII.

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-279898

⑤Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成1年(1989)11月10日

C 07 K 3/20  
A 61 K 37/465  
C 07 K 3/08  
15/06

ACC

8615-4C

8318-4H審査請求 未請求 請求項の数 21 (全8頁)

⑭発明の名称 第XⅢ因子のアフィニティクロマトグラフィーによる精製法

⑰特 願 平1-56556

⑱出 願 平1(1989)3月10日

優先権主張 ⑳1988年3月11日㉑西ドイツ(DE)㉒P 38 08 048.6

⑳発 明 者 ハルトムート・レーベルマン ドイツ連邦共和国デー-7801シヤルシュタト。モースヴァルトシュトラッセ7パー

㉑発 明 者 ユルゲン・レーミシュ ドイツ連邦共和国デー-3550マルブルク。ハーゼルヘケ48

㉒発 明 者 ヴェルナー・シュテューバー ドイツ連邦共和国デー-3551ラントール。ツエルパーヴェーク12

㉓出 願 人 ベーリングヴェルケ・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国マルブルク/ラント (番地なし)

㉔代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

## 明 細 書

1.発明の名称 第XⅢ因子のアフィニティクロマトグラフィーによる精製法

## 2.特許請求の範囲

1) 第XⅢ因子のaサブユニットをジスルフィド交換反応に通ずる担体マトリックスに可逆的に結合させ、そして還元剤との反応により担体マトリックスから取り外すことからなる、第XⅢ因子のaサブユニットのアフィニティクロマトグラフィーによる精製法。

2) 第XⅢ因子のaサブユニットが胎盤ホモジネートまたは血小板ホモジネートから得られることからなる請求項1記載の方法。

3) 第XⅢ因子のaサブユニットが血漿から得られることからなる請求項1記載の方法。

4) 第XⅢ因子が溶液中に存在することからなる請求項1～3のいずれかに記載の方法。

5) 第XⅢ因子または第XⅢ因子を含有する溶

液をアルキル化剤で予備処理することからなる請求項1～4のいずれかに記載の方法。

6) アルキル化剤がヨードアセトアミドまたはヨード酢酸であることからなる請求項5記載の方法。

7) ヨード酢酸が5～250ミリモル/l、好ましくは5～50ミリモル/lの濃度で存在することからなる請求項6記載の方法。

8) アルキル化がCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>の非存在下に行われることからなる請求項5～7のいずれかに記載の方法。

9) アルキル化がキレート形成性物質、好ましくは0.001～0.1モル/l特に好ましくは0.002～0.02モル/lの濃度のエチレンジアミン四酢酸の存在下に行われることからなる請求項6および/または7のいずれかに記載の方法。

10) 第XⅢ因子を含有する溶液を0.001～0.04

モル/lのエチレンジアミン四酢酸の存在下にpH6.5~8.5で0.005~0.25モル/lのヨード酢酸で1~360分、好ましくは5~60分処理することからなる請求項9記載の方法。

11) アルキル化物質がアルキル化が行われた後好ましくは透析またはタンパク質の塩沈澱により分離されることからなる請求項5~10のいずれかに記載の方法。

12) 血漿第XIII因子複合物を0.05~0.6モル/l、好ましくは0.05~0.2モル/lの濃度のCa<sup>2+</sup>またはMg<sup>2+</sup>とインキュベーションすることからなる請求項1または3~11のいずれかに記載の方法。

13) 第XIII因子を含有する溶液をメルカプト基を含有する担体マトリックス、好ましくはチオールセファロース4Bと接触させることからなる請求項1~12のいずれかに記載の方法。

0.005~0.05モル/lの還元剤好ましくはジチオトレイトール、メルカプトエタノール、エタンジチオール、グルタチオンまたはシステイン、および場合により0.1~0.7g/mlのスクロースを用いて溶離することからなる請求項13~16のいずれかに記載の方法。

18) 第XIII因子が天然のタンパク質、遺伝子工学により調製された第XIII因子またはそのα-サブユニット、および/または第XIII因子活性を有する任意の天然または人工的に生成されたタンパク質であることができる請求項1~17のいずれかに記載の方法。

19) 第XIII因子のα-サブユニットの活性がほとんど完全に保持されていることからなる請求項1~18のいずれかに記載の方法。

20) 請求項1~19のいずれかに記載の方法により精製された第XIII因子、および慣用の生理学的に受容されうる塩化ナトリウム、アルブ

14) 担体マトリックスへの結合が好ましくは0.01~0.2モル/lの濃度のCa<sup>2+</sup>またはMg<sup>2+</sup>の存在下に好ましくはpH6.5~8.5で行われることからなる請求項1~13のいずれかに記載の方法。

15) 担体マトリックスがジー2-ビリジルジスルフィド、2,2'-ジチオビス(ビリジンN-オキサイド)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、これら化合物の誘導体またはアゾジカルボン酸の誘導体との反応により予め活性化したものである請求項13または14に記載の方法。

16) 第XIII因子を負荷された担体マトリックスを0.01~0.2モル/lの濃度のCa<sup>2+</sup>またはMg<sup>2+</sup>を含有する溶液で洗浄することからなる請求項13~15のいずれかに記載の方法。

17) 担体マトリックスに結合された物質を0.01~0.2モル/lの濃度のCa<sup>2+</sup>またはMg<sup>2+</sup>および

ミン、グルコースまたはスクロースのような添加剤を含有することからなる治療用組成物。

21) 第XIII因子欠乏により惹起された凝固障害の治療への請求項20記載の治療用組成物の使用。

### 3.発明の詳細な説明

本発明は第XIII因子のα-サブユニットのアフィニティクロマトグラフィーによる精製法、治療用組成物および治療用組成物の使用に関する。

生体は自身を血液の損失から、ならびに血栓症から保護するために平衡関係にある2つの系すなわち凝固系および繊維素溶解系を有する。この2種の系の相互作用により、はじめに止血のための不溶性フィブリンポリマーが形成され、これが創傷が治癒される間に繊維素溶解なる溶解過程により再び分解される。

その場合、タンパク分解によりすでに活性化された酵素がカスケードの後続の酵素を活性化するしくみになっている相互にかみ合ったカスケード状に進行する過程の結果として安定した血栓が凝固過程の最終段階で形成されるのであり、それにより傷害の発生に対する生体の応答が増やされる。この過程の決定的に重要な最後の段階がフィブリンモノマーの重合である。フィブリンモノマーはそれらが形成されたのち静電力の作用により相互に平行に並んでいる。しかしながらこの状態においてはそれらは水素結合によってのみしか結合されておらず、水素結合を解離させる試薬、例えば、尿素により再び液化されうる。フィブリンモノマー間の共有結合はカルシウムイオンの存在下にモノマー間にペプチド結合を形成することにより行われる。このネットワーク形成は第ⅩⅢa因子と呼ばれる活性化された第ⅩⅢ因子により行われる。

バック精製工程、例えば分別エタノール沈澱、硫酸アンモニウム沈澱およびポリエチレングリコール沈澱、のみならずイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル透過に基づく非常に骨の折れる方法である。

Jan McDonaghらは(Biochimica et Biophysica Acta、446(1976)、345-357)アフィニティクロマトグラフィーによる第ⅩⅢ因子の精製法についてはじめて記載した。彼らはこの目的にアガロースに結合した安息香酸水銀を使用してゐる。この方法は血漿第ⅩⅢ因子のaサブユニットの水銀化合物への可逆的結合を提供するのである。Jan McDonagh氏他は、血漿因子のbサブユニットはそれ自体何ら遊離のチオール基を含有しないのでクロマトグラフィーマトリックスと相互作用できず、従ってこのものはaサブユニットがトロンビンによる分解により予備活性化されそして鋭くカルシウムでの処理によ

第ⅩⅢ因子は血液凝固系の酵素前駆体であり、血漿中ならびに血小板中に検出されうる。血漿中では相互に共有結合はしていないaサブユニットとbサブユニットの複合体として存在し、一方血小板中に存在するものはaサブユニットからのみ構成されている。第ⅩⅢ因子のこの2種の分子形は同じ酵素的機能を有する。トロンビンおよびカルシウムにより活性化されてはじめてこの活性化された第ⅩⅢ因子(第ⅩⅢa因子)がフィブリン中の特定のリジンとグルタミン残基との間のペプチド様結合の形成を触媒し、それによりフィブリンモノマーがネットワーク状に共有結合される。

遺伝的に決定される第ⅩⅢ因子の欠乏、または阻害剤により第ⅩⅢ因子の活性化が減退すると重大な血液凝固障害を生ずる。このため血漿性ならびに血小板性第ⅩⅢ因子の種々の精製法が開発されてきた。その一部は、知られたタン

り完全に活性化されるまでは非共有力によりaサブユニットに結合されたままであると記載している。それゆえ純粋なaサブユニットは前記著者らに記載された方法によればカルシウムとトロンビンでの処理後にのみ調製できる。その上そこに用いられている水銀化合物は毒性が高い。従ってそこに記載される方法はヒトの治療剤の調製には使用できない。

それゆえ本発明の目的は有毒な化合物の使用を回避することができる第ⅩⅢ因子のaサブユニットの改良された精製法を提供することである。

この目的は本発明により、前記した種類の方法において第ⅩⅢ因子のaサブユニットをジスルフィド交換反応に適する担体マトリックスに可逆的に結合させ、そして還元剤との反応により担体マトリックスから取り外すことによつて達成された。

ジスルフィッド交換反応に通ずる担体マトリックスに第ⅩⅢ因子のaサブユニットを可逆的に結合させることは有毒なクロマトグラフィー物質の使用を回避できるという長所がある。その上、第ⅩⅢ因子を含有する溶液中に含有されるすべてのタンパク質は遊離のメルカプト基に対する反応性が低いいためまたは遊離に際し第ⅩⅢ因子と異なる挙動をする結果、ジスルフィッド結合を還元する試薬を用いて遊離すると第ⅩⅢ因子から分離されうる。その上本発明方法においては血漿第ⅩⅢ因子のbサブユニットをaサブユニットから除去できる。今驚くべきことに、血漿第ⅩⅢ因子複合物はMcDonaghにより提示された意見と反対にトロンビンの非存在下にカルシウムまたはマグネシウムを含有する溶液中でインキュベーションすることによりbサブユニットと生物学的に活性なaサブユニットに分解することが見出された。bサブユニット

りなく第ⅩⅢ因子をアフィニティクロマトグラフィーによる精製のために溶液中において入手できる。この目的には、例えば血液から高分子タンパク質を沈澱または遠心分離により除去することによるかまたは第ⅩⅢ因子を含有する組織をホモジナイズおよび続いて遠心分離することにより適当な生物学的物質を調製する。

C.G. Curtis他(Biochemistry 13, 1974, 3774-3780)により、第ⅩⅢ因子を周期律表の第Ⅱa族の二価イオンの非存在下にアルキル化剤で処理しても第ⅩⅢ因子の生物学的活性には何の影響も及ぼさないことが開示されている。この著者らは、aサブユニット中の第ⅩⅢa因子の活性システインは通常保護された形態であることを示すことができた。カルシウムイオンを同時に添加してはじめてこのシステインがコンホーメーションの変化により露出されそれにより同様にアルキル化されうる。かくして完全

それ自体は何ら遊離のメルカプト基を有せず、システインにより付与されるすべてのSH基はbサブユニット内にジスルフィッド結合の形で存在するので、これらは担体マトリックスには結合せず従って洗浄により除去されうる。

第ⅩⅢ因子は第ⅩⅢ因子濃度の高い物質のホモジネートから得られるのが好ましい。それらは例えば胎盤組織および血小板が包含される。この2種の物質から単離された第ⅩⅢ因子はaサブユニットからのみ成っている。

生物学的に活性な第ⅩⅢ因子も同様に胎盤から得られうる。しかしながらすでに記載したとおり、血漿第ⅩⅢ因子は非共有的に相互に結合した2種のサブユニット、すなわちaサブユニットとbサブユニットの複合体から成っている。本発明によりこの第ⅩⅢ因子複合体から生物学的に活性なaサブユニットが得られる。

本発明による方法にとって、その起原に関わ

にS-アルキル化された第ⅩⅢa因子はトロンビンによる分解後でも不活性である。今驚くべきことに、第ⅩⅢ因子を含有する溶液をカルシウムまたは同等のイオンの非存在下にアルキル化剤で処理し続いてアフィニティクロマトグラフィー精製することにより生物学的に活性な高純度の第ⅩⅢ因子調製物が得られうることが見出された。

その際アルキル化剤としてヨードアセトアミドまたはヨード酢酸が使用されるのが好ましい。しかしながら本発明には同様のアルキル化能力を有する任意の他の試薬も使用できる。

アルキル化するには、それぞれのアルキル化剤を当業上知られた操作に従い約5~250ミリモル/lの濃度で添加すべきである。好ましい態様は5~50ミリモル/lの濃度のヨード酢酸で処理することである。

本発明によればアルキル化はCa<sup>2+</sup>または同様



の作用を有するイオンの非存在下を実施される。そうでない場合は、 $\alpha$ サブユニットのコンホメーションの変化により活性中心もアルキル化を受けることになり従って遮断される。それゆえ $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Mg}^{2+}$ を含有しない緩衝液を使用することが重要である。

好ましい態様においてはアルキル化はキレート形成剤を添加して実施される。この目的には0.001~0.1モル/lの濃度のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を使用するのが特に好ましい。

本発明によれば第XIII因子を含有する溶液のアルキル化は第XIII因子が何ら主要なコンホメーション変化を受けないpHで実施される。それゆえ生理学的なpH値に近いpHが用いられるのが好ましい、すなわちアルキル化はpH6.5~8.5で実施される。分子の三次構造が $\text{Ca}^{2+}$ により誘発されて変化して $\alpha$ サブユニットの活性中心が露出されるのを阻止するためには、反応混合物

を分離する場合は、これを非共有により会合している $\beta$ サブユニットから分離する必要がある。これは場合によりすでにアルキル化されていてもよい血漿第XIII因子を0.05~0.6モル/l特に好ましくは0.05~0.2モル/lの濃度のカルシウムイオンまたはマグネシウムイオンとインキュベーションすることにより行われるのが好ましい。カルシウムまたはマグネシウムの存在下に5分から2時間インキュベーションしたのちに $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが解離状態となる。血漿第XIII因子から $\alpha$ サブユニットを単離する場合は、ジスルフィド交換反応に適する物質への下記吸着を実施するのにサブユニットのこの解離が必要な前提条件である。

予備処理されていないかまたは予めアルキル化物質で処理された第XIII因子含有溶液を次にジスルフィド交換反応に適し、遊離のメルカプト基を含有する担体マトリックスと接触させる。

に0.001~0.04モル/lのEDTAを添加するのが好ましい。そこでアルキル化は例えば0.005~0.25モル/lのヨード酢酸を用いて実施される。しかしながらそれより高いかまたは低い濃度のヨード酢酸も使用できる。反応は通常1~360分間行われる。しかしながら露出されているメルカプト基を完全にアルキル化するには、5分以上反応させるべきである。反応時間に限定はないが、遅くとも60分後には、露出されているメルカプト基が充分にカルボキシメチル化されると予測されうる。

アルキル化を行ったのち、アルキル化物質を再び溶液から除去する。これは当業者に知られた方法、例えばゲル濾過、塩沈澱および/または透析により行うことができる。アルキル化物質が定量的に溶液から除去されるならば他のいずれの方法もこの目的に等しく用いられうる。

血漿第XIII因子から活性 $\alpha$ サブユニットを単

ジスルフィド交換反応に適する好ましい物質の例をあげればチオールセファロース4Bである。この反応はいわゆるパッチ法および分取用カラムの両方で行うことができる。

本発明によれば第XIII因子を含有する溶液を好ましくは0.01~0.2モル/lの濃度のカルシウムまたはマグネシウムイオンの存在下にマトリックスと接触させる。吸着は事実上生理学的pH、好ましくはpH6.5~8.5で行うべきである。

本発明によれば、担体マトリックスのメルカプト基をそれ自体知られた方法でジ-2-ピリジルジスルフィド、2,2'-ジチオビス(ピリジンN-オキシド)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、これら化合物の誘導体またはアゾジカルボン酸の誘導体と反応させることにより予め活性化しそれにより後述加えられる検体とジスルフィド結合を形成する準備ができる。

メルカプト基を含有するマトリックスに第XⅢ因子が結合されたのちこのマトリックスを、0.01~0.2モル/ℓ濃度のカルシウムまたはマグネシウムを含有する溶液で洗浄する。それ自体何らシステインを含有しないゆえであろうとそれらのメルカプト基が予めアルキル化されているゆえであろうとマトリックスと相互作用できない第XⅢ因子含有溶液中の他のすべての成分は定量的に溶離され、血漿からの第XⅢ因子の場合はカルシウムまたはマグネシウム処理によりaサブユニットから分離されたbサブユニットも同様に溶離される。

続く操作段階において第XⅢ因子のaサブユニットがマトリックスから溶離される。溶離剤としてはジスルフィド交換反応に適し、マトリックスに結合された第XⅢ因子aサブユニットと置換しそして同時にマトリックスとaサブユニットとの間のジスルフィド結合を還元す

本発明方法により精製期間中その活性がほとんど完全に保持されたまま残る第XⅢ因子調製物が得られる。

本発明方法により得られた第XⅢ因子は治療用組成物に使用されうる。

好ましい組成物は第XⅢ因子の他に生理学的に受容されうる成分例えば塩化ナトリウム、アルブミン、グルコースまたはスクロースを含有しておりそして注入に適するものである第XⅢ因子含有溶液である。

かかる治療剤はとりわけ第XⅢ因子欠乏性疾患の治療に使用できる。本発明により得られた第XⅢ因子のもう一つの好ましい使用法は、例えば保存血または赤血球濃縮物に混合して、大出血後に輸血される血液の凝固能力を保持することである。

第XⅢ因子を精製するための本発明による方法を以下の実施例により説明する。

るものであるあらゆる試薬が用いられうる。好ましい態様では0.01~0.2モル/ℓの $\text{Ca}^{2+}$ または $\text{Mg}^{2+}$ の存在下に0.005~0.05モル/ℓの還元剤好ましくはジチオトレイトール、メルカプトエタノール、エタンジチオール、グルタチオンまたはシステインを用いて溶離が行われる。活性なaサブユニットの収量増大をもたらすものである特に好ましい態様では、溶離剤に0.1~0.7g/ℓのスクロースを添加して実施される。

本方法は天然源から単離された第XⅢ因子に対してのみならず、遺伝子工学により細菌、酵母または細胞培養物において生成された第XⅢ因子に対しても同様に適用できる。その上この方法は活性中心のシステインがカルシウムイオンまたは同様の作用を有するイオンの添加によるコンホーメーション変化の影響を受け続けるならば、第XⅢ因子活性を有するあらゆるタンパク質にも適用できる。

#### 実施例 1

ジー2-ビリジルジスルフィド、エルマン試薬または2,2'-ジチオビス(ビリジンN-オキシaid)を用いるチオール-セファロース4B®の活性化

チオール-セファロース4B®の50mℓを、0.03モル/ℓのメルカプトエタノールを添加した緩衝液A(0.05モル/ℓのトリス/HCl(pH7.5)、0.15モル/ℓのNaCl)と室温ではじめに30分間処理した。次に樹脂物質を緩衝液Aで洗い、そして1.5ミリモル/ℓのジー2-ビリジルジスルフィドをさらに添加したこの緩衝液と反応させた。活性化および樹脂マトリックスのメルカプト基の保護が完結したのちこれを緩衝液Aで洗いそしてこの樹脂マトリックスをジスルフィド交換反応に用いた。

ジー2-ビリジルジスルフィドの代りに例えば5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)

(エルマン試薬)または2,2'-ジチオビス(ピリジンN-オキシド)を同じモル濃度で活性化に使用することもできる。

#### 実施例 2

第XⅢ因子を含有する溶液と活性化されたチオール-セファロース4B®との反応

700Uの第XⅢ因子(第XⅢ因子1単位はクエン酸添加した正常血漿1ml中の第XⅢ因子含量に相当する)を含有する溶液50ml中に40%(w/v)の硫酸アンモニウムを飽和させた。

硫酸アンモニウム残留物を緩衝液A(実施例1参照)で4℃で一夜透析し次に30ミリモル/lのCaCl<sub>2</sub>を加えた。例えば実施例1に記載されるように活性化された活性化チオール樹脂を、30ミリモル/lのCaCl<sub>2</sub>が添加された緩衝液Aを用いて平衡となした。カルシウムを含有する透析物を予め調製してあるアフィニティマトリックスに加え、次に樹脂を緩衝液A(30ミリモル

次に0.3モル/lのCaCl<sub>2</sub>および0.1g/mlのスクロースを加えた。4℃で60分間インキュベートしたのちこの溶液を例えば実施例1におけるようにして活性化されたチオール樹脂に加え、そして0.05モル/lのトリス/HCl(pH7.5)、0.15モル/lのNaCl、0.1モル/lのCaCl<sub>2</sub>および0.1g/mlのスクロースからなる緩衝液Bを用いて平衡となした。次に樹脂物質を緩衝液Bで洗い、そして20ミリモル/lのL-システインを加えた緩衝液Bで溶離した。

この溶出液は820Uの第XⅢ因子を含有しておりそしてbサブユニットは含有していなかった。

#### 実施例 5

第XⅢ因子を含有する溶液のアルキル化および続く活性化チオール-セファロース4B®との反応

700Uの第XⅢ因子を含有する溶液50mlを5

/l CaCl<sub>2</sub>含有)で洗いそして15ミリモル/lのジチオトレイトールおよび30ミリモル/lのCaCl<sub>2</sub>を添加した緩衝液Aを用いて第XⅢ因子を溶離した。溶出液は500Uの第XⅢ因子を含有していた。

#### 実施例 3

洗浄緩衝液および溶離緩衝液にさらに0.5g/mlのスクロースを加える以外は実施例1および2に記載されるようにしてチオール-セファロース4Bを活性化させそして第XⅢ因子を含有する溶液と反応させた。溶出液は600Uの第XⅢ因子を含有していた。

#### 実施例 4

血漿第XⅢ因子を含有する溶液と活性化されたチオール-セファロース4B®との反応

1000単位の第XⅢ因子を含有するがトロンビンは何ら含有しない血漿第XⅢ因子含有溶液50mlを緩衝液A(実施例1)で4℃で一夜透析し

ミリモル/lのEDTAを加えた緩衝液Aで透析しそして次に10ミリモル/lのヨード酢酸と室温で1時間インキュベートした。この溶液に40%(w/v)硫酸アンモニウムを飽和し、そして沈澱を実施例2に記載されるようにしてさらに処理した。

スクロースを添加しない場合は450Uの第XⅢ因子が溶出液中に、そしてスクロースを添加すると580Uの第XⅢ因子が洗浄緩衝液および溶出緩衝液中に回収された。アルキル化後にアフィニティ樹脂から溶離された第XⅢ因子の純度はアルキル化されてない第XⅢ因子物質のそれに比較して明らかに高かった。

溶液中における第XⅢ因子の生物学的活性をBehringwerke AG社のフィブリン架橋テストにより測定した。この目的には検体をpH7.6のジエチルカルビツレート/アセテート緩衝液を用いて1:5、1:10、1:20、1:40等に連続

希釈した。次に検体希釈物50 $\mu$ lずつにCa／トロンビン／カオリン溶液0.1mlを加えそしてこの混合物を37℃で10分間インキュベートした。その直後に5%モノクロロ酢酸溶液1mlずつを加え、さらに2分間インキュベートし、はげしく振盪したのち溶液のカオリン濃度を測定した。

特許出願人    ベーリングヴェルケ・アクチエン  
                    ゲゼルシャフト

代 理 人    弁理士    高    木    千



外 2 名